

プロジェクト名 : 地球生命システムの環境・遺伝基盤の解明とモデル化・予測に向けた研究

プロジェクトディレクター：神田啓史

1. プロジェクト体制

[国立極地研究所] 藤井理行、本山秀明、東久美子、藤田秀二、伊村 智、工藤 栄、内田雅己、瀬川高弘、植竹 淳、金子 亮、中澤文男、上野 健、真壁竜介

[国立遺伝学研究所] 仁木宏典、小原雄治、菅原秀明、鹿児島浩、鈴木えみこ、馬場知哉、柳原克彦

[国立情報学研究所] 藤山秋佐夫、武田秀明、市瀬龍太郎、荒井紀子、小林悟志

[北海道大学] 福井 学

[秋田大] 井上正鉄

[千葉大] 竹内 望

[玉川大] 吉村義孝

[東京薬科大] 山岸明彦、横掘伸一

[日本大] 成田貴則

[日本海洋技術研究機構] 高野淑識

[東京大] 小方康至

[長浜バイオ大] 池村淑道、阿部貴志

[京都大学] 幸島司郎

[京都府立大] 牛田一成

[立命館大] 今中忠行

[広島大] 長沼 毅

2. 今年度の研究概要

2-1. 前年度の研究成果

サブテーマ「古環境タイムカプセルとしての氷床コアの解析」では、3035.22m まで採取した深層氷床コア（ドーム氷床コア）微生物解析を引き続き行った。同時に、最深部の有機物及び岩盤破片の解析および時間軸に沿った氷床コア微生物の解析を行った。南極の氷床コア及び極限環境から時間軸にそった微生物相を明らかにすることは本研究の最終目的であるが、本年度は氷床コア中に見いだされるダストの詳細な研究を行った結果、微生物とダストが時間軸に沿って傾向を示す貴重なデータが得られた。さらに開発研究として、ドームふじ基地の氷床下から採取された大陸起源と考えられる微量な氷から、氷内部の試料を無菌的に採取するための融解装置の開発をおこなった。作成した融解装置を用いて遺伝子の増幅が確認された。DNA データベースと照合し菌種の推定を行った結果、各種

バクテリアや、光合成生物であるシアノバクテリアに近縁な遺伝子配列を検出することに成功した。

サブテーマ「極限域生物の比較研究」では難培養微生物のゲノム解析法、耐性遺伝子の分析手法の開発、微生物の顕微解析法、微生物の培養法による遺伝学的解析などの開発を引き続き行った。とくに難培養微生物に関連して、南極氷床コアに対するメタゲノム解析の開発を進める一方、平成19年度より開始している古環境の遺伝資源を解明する究極的な氷床コアの微生物解析として、1細胞からのゲノム解析手法を開発した。細胞数の少ない難培養微生物の解明のために、レーザーマイクロダイセクション法による微生物の1細胞分取を試み、全ゲノム DNA 増幅とゲノム・ライブラリー構築の実用化について検討した。分取した細胞の16S rDNA 由来の DNA 増幅断片はDNA シークエンスを行い、既知配列情報と比較を行った結果、増幅16S rDNA断片の塩基配列情報から細菌の分類推定に成功した。これらにより極限環境の微生物データベースの情報を加えることにより、新たな古環境指標として利用できる可能性を明らかにした。さらに、広域の雪氷試料から微生物、大気生物成分、環境指標としての生物起源物質を明らかにし、これまでに未知であった雪氷生物の生態を解明した。

一方、これまでに実施してきた南極産線虫、露岩域植物多様性、湖沼微生物、湖底・海底堆積物の微生物群集構造、デッドチムニー等の分離株解析、遺伝子解析および生理生態学的解析、及び雪氷生物の生態、大気生物成分の供給源に関する検討、氷床の年代等環境データの整理、Webマイニングによる微生物情報取得、およびデータベース構築を引き続き行った。とくに、湖沼コケ坊主微生物の分子生物学的解析において、古細菌、シアノバクテリア、真核生物が酸化還元条件下に異なる生物種が存在している新たな知見が得られた。南極産線虫遺伝子解析、露岩域植物多様性、湖底・海底堆積物の微生物群集構造の解析、3D画像解析等極限域の生物システムに関する研究を行った。

平成20年5月、カナダ、バンフでの極域、高山域微生物シンポジウム、7月、ロシア、サンクトペテルブルグでの SCAR/IASC/ IPY 合同国際会議、12月、極地研主催の極域気水圏・生物圏合同シンポジウム融合研究セッション等において、融合プロジェクトメンバーによる多数の研究論文が発表された。

2-2. 今年度の研究目標

今年度は本プロジェクトの5年計画の最終年度として、成果をとりまとめる。サブテーマ「古環境タイムカプセルとしての氷床コアの解析」では南極の氷床コア及び極限環境から得られた微生物の本格的抽出を行い、時間軸にそった微生物相を明らかにする。とくにドーム氷床コア最深部の3035.22mの氷床コアの有機物及び岩盤破片の解析を実質的に行う。さらに、得られた深層の氷床微生物がどこから由来するかを解明することは重要であり、表面雪氷の微生物を含んだ広域を対象にした研究も進めてきた。そのため、南極露岩域に生育するシアノバクテリア、藻類、蘚類のシークエンスデータを取りまとめる。

一方、昨年来、表床コア中のダストと微生物との関連がつかめたことにより、表床深層コアの年代と微生物の関連を解明する。同時に、グリーンランド、アラスカ、南米、アジア高山域より得られた広域の雪氷微生物、大気生物成分、環境指標としての生物起源物質を明らかにし、雪氷微生物の分類系統と生態を解明する。

表層雪氷や氷床コアを対象とした微生物層の解明についてはメタゲノム解析によって取得された比較的短いDNA断片配列の解明を目指してきたが、これまで開発してきた系統推定法や短いDNA断片配列においても高精度な系統推定が実施できるように引き続き、手法を改良することが必要である。相同性検索や機能モチーフ検索を補完する適用範囲の広いタンパク質の機能推定法の開発を試み、有用遺伝子の探索、系統推定解析を行うためのソフトウェアの更なる拡充を行う。また、細胞数の少ない難培養微生物の解明のために、南極氷山氷、氷床表面雪氷、氷床コア氷からのレーザーマイクロダイセクション法による微生物の1細胞分取法がある程度、目途が立ったことにより、連続したPhi29 DNA polymerase法による全ゲノムDNA増幅とゲノム・ライブラリー構築の実用化を目指す。構築したゲノム・ライブラリーの評価のためにシーケンスを行い、シーケンス情報から分取した微生物1細胞のゲノム情報の復元を試みる。得られたゲノム情報を基にしたバイオ・インフォマティクス解析を開拓する。古環境の解析のため、氷床深層コアの基本解析を継続する。ドームふじ氷床深層コアの基本解析として全層にわたる水安定同位体（酸素、水素）、溶存イオン、ダスト、pH、電気伝導度を目的とするが、優先的に第2期コアの2400m以深を10cm間隔で連続分析する（約100-200年の時間分解能）。

一方、サブテーマ「極限域生物の比較研究」では湖沼微生物、南極産線虫、露岩域植物多様性、湖底・海底堆積物の微生物群集構造の解析、デッドチムニー等の分離株解析、遺伝子解析、生理性状解析、氷床の年代等環境データの整理、Webマイニングによる微生物情報取得、およびデータベース構築を本プロジェクトの最終年度として、引き続き行う。湖沼生態系の研究では平成18年度以降、一個の完全なコケ坊主について行った16S/18S rRNA 遺伝子及び二酸化炭素固定酵素（ルビスコ）、硝酸還元酵素群、窒素固定酵素等の遺伝子のPCRクローンライブラリーの作成とその大量解析を行う。また、その第一のコケ坊主について、物質生産・物質循環に関与する酵素のうち、南極線虫においては温暖、多湿の標準条件と寒冷状態、または乾燥条件においた *Panagrolaimus davidi* から cDNA ライブラリーを構築し、配列の解析を行う。線虫から抽出されたタンパク質は2次元展開し、標準状態でのタンパク質の発現状態と比較、極限環境において発現が変化するタンパク質、すなわち、発現タンパク質の解析を行う。これらの方法により、寒冷（凍結）耐性遺伝子、乾燥耐性遺伝子を探索する。南極に生息する線虫の包括的な形態分類、および分子系統解析を行う。データベース構築については、極地研収蔵コケ類資料から迅速かつ安定にDNA抽出を行うための条件検討を徹底し、情報研、遺伝研と連携しつつゲノムデータの取得と解読を行う。これまでの南極昭和基地周辺の淡水藻類（冰雪藻類を含める）、地衣類、蘚苔類、種子植物の野外標本および培養標本を用いて、画像データを含めた分類学的研究を進

める。

2-3. 研究推進の考え方

平成 19 年 1 月、南極ドームふじ基地における深層掘削は 3035.22m に達し、有機物と思われるもの、岩盤の粒状物と思われる試料の採取に成功した。これにより、氷床コア最低部の微生物の存在を確認することにより、時間軸と生物進化を目標とした氷床コアから抽出される微生物の情報が得られるばかりではなく、岩盤近辺が液体状になっており、それに伴って微生物が流動的になっている可能性がある。ロシアのポストーク基地の深層掘削氷床コアの微生物解析は今や、人為的汚染から解放される目途が立たず、暗礁に乗り上げた状態といえる。そのことから、ドームふじ基地における南極の氷床微生物の抽出、解析は一層重要かつ緊急な状況となっている。無菌的に抽出する方法はサンプル量の多い浅層掘削氷床サンプル、氷河生物、冰山氷などでは有効であるが、2,500m 以深の深層掘削氷床サンプルは物理、化学、生物情報を効率よく収集する方法を確立することが重要である。さらに、現在までに、国際的にも十分な方法が確立されておらず、日本の技術を駆使して先導的な研究を切り開くことが急務となっており、引き続き、開発研究を行う必要がある。一方、環境軸と生物システムの比較研究として、南極、北極（グリーンランド）及びアラスカ、南米、アジアなどの極地周辺域の様々な極限環境から収集されてきた氷床コアをはじめとした氷雪、湖沼水、岩石、大気、及び微生物試料から微生物を抽出し、遺伝・環境基盤の解析を迅速に進めていく必要がある。

以上の理由によって、本研究の推進が一層望まれる。

2-4. 期待される効果

氷床氷、冰山氷などの雪氷圏からの微生物の抽出法、検出法が可能になれば、地球環境に飛来する生物の過去 72 万年前の過去の生物のタイムカプセルの復元が期待される。これらの環境には“進化が遅れた”過去の微生物が生き残っている可能性があり、地球上では雪氷圏以外では入手できない貴重な“生きた微生物化石”の宝庫ともいえる。遺伝的変異を主とした進化学的研究、新規及び有用微生物の発見につながる先端的な研究が期待できる。

本研究の独創性は雪氷圏及び極限環境から得られた試料を無菌的に処理し、微生物を抽出、検出する方法の開発である。とくに現場で得られた試料を無菌的に処理ができる現場実験施設のフィージビリティ、及び現地から日本に持ち帰った後の処理法、試料の保存法、抽出法、検出法、とくに現場の環境データ、生態学的特長を考慮した上での、全菌数計数、16S rRNA 遺伝子等による群集解析をルーチン的に実現させることは新しい領域として期待できる。

3. サブテーマの構成

1) 古環境タイムカプセルとしての氷床コア解析

時間軸と生物の関係に着目した新しい学問領域である。ドームふじ基地の氷床コアから約72万年に亘って封印された古環境を復元し、微生物のゲノム情報を得ることにより、微生物がどのように地球環境と相互作用してそのシステムを多様化・進化してきたのかを明らかにする。

2) 極限環境生物システムの比較研究

極限環境に生息する生物研究は現代の環境軸に沿うものであり、極低温や強紫外線という極限環境下で生息する生物の遺伝子構成、発現パターンや機能を解析して地球の生命システムを明らかにする。

4. 今年度の予算金額及びその内訳

費目	金額	主な用途	
人件費	46,440	新規	
		研究員（短時間）雇用（10万 x 12ヶ月 x 1名）	1,200
		特任技術専門員雇用（32万 x 12ヶ月 x 1名）	3,840
		継続	
		研究員雇用（50万 x 12ヶ月 x 2名）	12,000
		研究員雇用（40万 x 12ヶ月 x 5）	24,000
		研究員（短時間）雇用（15万 x 12ヶ月 x 2名、）	3,600
事務員（短時間）雇用（15万 x 12ヶ月 x 1名）	1,800		
物件費	110,000	1. マイクロフリューイト型遺伝子解析システム (BIOMARK)	29,000
備品費		2. 蛍光顕微鏡撮影装置デルタビジョン	21,000
		3. マイクロダイゼーション顕微鏡	19,000
		4. 高分解能 X線マイクロ CT スキャナ (SKYSCAN 1000/2000)	15,000
		5. イオンクロマトグラフ	10,000
		6. 全有機体炭計	10,000
		7. ダスト分析装置	6,000
消耗品費	35,000	分析試薬類・器具類	35,000
		内訳	
		鋳型調整試薬	5,000
		蛍光シーケンシング試薬	5,000

新領域融合プロジェクト
平成21年度 計画書

旅 費	20,000	プラスチック器具	7,500
		泳動試薬・キャピラリー	5,000
		前処理試薬	6,500
		雪氷試料分析用	6,000
謝 金	1,000	グリーンランド、スバルバル、エルズミア	20,000
その他	36,200	アラスカ、チリ、エクアドル	
		資料整理費	1,000
		派遣社員（分析補助）（40万 x 12ヶ月 x 3名）	14,400
		データベースデータ入力費	1,800
		氷床掘削国際共	10,000
		ソフトウェア開発委託	5,000
		微生物同定試験・新種登録	3,000
		広報・ホームページ	1,000
		輸送費（グリーンランド、エルズミア等）	1,000
合 計			248,640 千円

< 1品もしくは1組が500万円以上の物件リスト >

- | | |
|------------------------------------|----------|
| ①マイクロフリューイト型遺伝子解析システム
(BIOMARK) | 2,900 万円 |
| ②蛍光顕微鏡撮影装置デルタビジョン | 2,100 |
| ③マイクロダイゼーション顕微鏡 | 1,900 |
| ④高分解能 X線マイクロ CT スキャナ | 1,500 |
| ⑤イオンクロマトグラフ | 1,000 |
| ⑥全有機体炭計 | 1,000 |
| ⑦ダスト分析装置 | 600 |

5. その他

なし